

EVALUACIÓN DE SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN PH NEUTRO SoluVet® SOBRE CALIDAD DEL HUEVO PARA PLATO Y SUPERVIVENCIA DE EMBRIONES DE POLLO, CONTAMINADOS CON *Campylobacter jejuni*

L. Santos-Ferro^a, A. Rivera-García^a, J. Medina-Gudiño^a, J.C. Ramírez-Orejuel^b, D. Paez-Esquiliano^c, P. Ochoa-Galván^d, E. Andrade-Esquivel^e, J.A Cano-Buendía^{a*}

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.^a Depto. Microbiología e Inmunología. ^b Depto. Bioquímica y Nutrición Animal. ^c Depto. Fisiología y Farmacología. ^d Depto. Genética y Bioestadística. ^e Instituto Tecnológico de Celaya; Departamento de Ingeniería Bioquímica; 38010; Guanajuato, México. jcano@unam.mx

RESUMEN:

A nivel internacional, la industria alimentaria y el sector salud enfrentan un aumento en incidencias de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en productos como huevo y carne de pollo por microorganismos como *Campylobacter jejuni*, responsable del 80–85% de las infecciones entéricas del género en humanos (Kanji, 2015). La Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) con pH neutro SoluVet® fue evaluada como desinfectante en el lavado del huevo para garantizar su inocuidad y contribuir a la disminución de ETAs. Se evaluó: viabilidad de huevos embrionados, frescura en huevo para plato, integridad de la cutícula y contenido de calcio, magnesio y fósforo por técnicas de espectrometría. Se realizó una comparación con una solución de ácido cítrico al 2% (AC) y un grupo sin tratamiento (ST). Los huevos tratados con SoluVet® mostraron un aumento en la supervivencia embrionaria. En huevo para plato mantuvo mayor grado de frescura y tuvo la menor afectación en el contenido de minerales en cascarón. La diferencia estadística en el cambio total de color (ΔE) fue asociada al daño del AC sobre la cutícula. Los resultados muestran que SoluVet® puede ser recomendado en el lavado de huevo al aumentar la viabilidad y mantener características de calidad.

ABSTRACT:

Worldwide, the food industry and the health sector are facing increased incidences of foodborne in products like egg and chicken meat by pathogenic microorganisms like *Campylobacter jejuni*, which is responsible for 80-85% enteric infections of the genus in humans (Kanji, 2015). The Neutral Electrolyzed Water (NEW) SoluVet™ was evaluated as disinfectant to wash eggs and ensure their safety and contribute to the reduction of infections in poultry broilers. We evaluated the viability of embryonated eggs, table eggs freshness, and integrity of cuticle and content of calcium, magnesium and phosphorus by spectrometry techniques. We compared the obtained results with those obtained with embryonated eggs treated with 2% citric acid (AC) and a group without treatment (ST). Embryo eggs treated with SoluVet® showed an increase in rate survival. Table eggs keep a greater degree of freshness and had the least decrease in the mineral content in eggshell. The statistical difference in total color change (ΔE) was associated with damage by citric acid on the cuticle. These results show that SoluVet™ can be recommended for egg wash increasing the viability and keeping quality characteristics.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, ETAs, Solución Electrolizada de Superoxidación

Keywords: *Campylobacter jejuni*, foodborne, New Electrolyzed Water

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

México es el 7° productor de pollo, 6° productor de huevo y 1er consumidor de éste a nivel mundial (UNA, 2014). La industria alimentaria y el sector salud se enfrentan al aumento en incidencias de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) por microorganismos patógenos como *Campylobacter jejuni*. Se trata del tipo de carne de mayor producción en el país (INEGI, 2014) en la cual se han aplicado diferentes técnicas, procesos y productos para asegurar la ausencia de agentes causales de enfermedades. Especialmente, *C. jejuni* es capaz de provocar infecciones reflejadas como gastroenteritis agudas, dolor abdominal y fiebre en un tiempo de 5 a 7 días. Es la especie responsable del 80–85 % de todas las infecciones entéricas del género en humanos. Adicionalmente, presenta factores de patogenicidad muy semejantes a otras bacterias, aspecto que incrementa su riesgo y posibilidad de colonización (Kanji, *et. al.*, 2015).

De esta manera, se expone a la Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) como posible desinfectante contra *C. jejuni* en huevo para garantizar su inocuidad, destacando como principales ventajas la baja toxicidad de la solución en tejidos y su fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho (Guentzel *et. al.*, 2008). Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de huevo embrionado y la calidad por medio de las Unidades Haugh, contenido de calcio, fósforo y magnesio, así como el cambio total de color (ΔE) de huevo para plato, tratados con Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) con pH neutro. Los resultados se compararon con huevos embrionados y para plato contaminados con *Campylobacter jejuni* y tratados con una solución de ácido cítrico 2 % (AC) y un grupo control tratado con solución salina fisiológica (ST).

Se obtuvo un mayor número de nacimientos en huevos embrionados tratados con SES (50 %), seguido de AC 2% (43.94%) con respecto al control (ST) en el cual se tuvo 27.27% de viabilidad. Por su parte, los valores de unidades Haugh fueron 8.28, 16.68 y 23.90 en los tratamientos ST, AC y SES, respectivamente. Existió una disminución de 16.4 % de Ca^{+2} y 21.5% de P en los cascarones con AC y únicamente de 9.7 % de Ca^{+2} y 16.4 % de P en los tratados con SES, siendo los valores de 302.4 mg Ca^{+2} /g de cascarón y 698 ppm de P, correspondientes al grupo ST. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el contenido de magnesio entre tratamientos. Finalmente, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ΔE de todos los tratamientos.

Como conclusión se plantea que el tratamiento con la SES en huevo embrionado obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad, asociado al posible efecto bactericida, por lo que una perspectiva para este estudio es cuantificar al microorganismo utilizando métodos moleculares. Además, se observó un mayor grado de frescura en los huevos para plato tratados con SES, asociado a un menor daño en la cutícula y, al mismo tiempo, esta menor afectación a la cutícula se vio reflejada en la menor pérdida de minerales, mientras que las diferencias en el cambio total de color (ΔE) se deben a las distintas afinidades que presentó el colorante en cada caso y a una mayor afectación de la cutícula por parte del ácido cítrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras y cepa

La Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) con pH neutro SoluVet® fue proporcionada por Esteripharma México S.A. de C.V. Se evaluaron sus propiedades físico-químicas: pH, potencial óxido-reducción (ORP) y concentración de cloro de ultra alta gama o total. Los huevos embrionados fueron adquiridos en Aves Libres de Patógenos Específicos S.A. de C.V. (ALPES). Los huevos para plato fueron enviados del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola CEIEPAv, dependiente de la FMVZ. La cepa liofilizada de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection), siendo reactivada en agar Brucella (BD BBLTM 211086).

Evaluación en huevo embrionado

Para los tres tratamientos (3 réplicas, n=22 huevos/tratamiento), se realizó una simulación de contaminación horizontal por inmersión de los embriones en una mezcla del inóculo con agua peptonada 0.1% por 10 min. Enseguida se secaron por 26 min y desinfectaron por aspersion (60 veces). Los embriones permanecieron en incubación a 37°C (Incubadora Marca Farm Master No. 300742) por 17 días, considerando que a su recepción tenían 4 días de edad. Además, cada 4 días se realizó el ovoscopiado de todos los embriones para la construcción de la curva de viabilidad total.

Evaluación de cutícula en huevo para plato

Se llevó a cabo el mismo proceso de contaminación y tratamiento (2 réplicas con n=7 huevos/tratamiento). Posteriormente, se realizó la medición de parámetros colorimétricos (L^* , a^* y b^*) iniciales de todos los huevos (Equipo Konica Minolta CM-600d No. 21011486), y la medición final posterior a su tinción por inmersión 1 min en azul tripán 0.1%, enjuague de 3 s en agua y secado. Se calculó la diferencia de color total (ΔE). Metodología basada en Bialka (2004).

Evaluación de frescura en huevo para plato

Posterior a su evaluación de color, todos los huevos fueron pesados y quebrados. Se realizó la evaluación altura de albumen denso (Micrómetro de Haugh Marca Baxlo), para su posterior cálculo de unidades Haugh (NMX-FF-079-SCFI-2004).

Determinación de calcio y magnesio por espectrofotometría de absorción atómica

Realizado a partir del secado, calcinación y digestión ácida (HCl 25 %) de los cascarones y las diluciones correspondientes a cada mineral. Se realizó la lectura de absorbancia en el equipo a longitudes de onda de 422.7 nm y 285.2 nm para Ca^{+2} y Mg^{+2} , respectivamente, contra curvas patrón. Basado en el Método oficial AOAC 985.35.

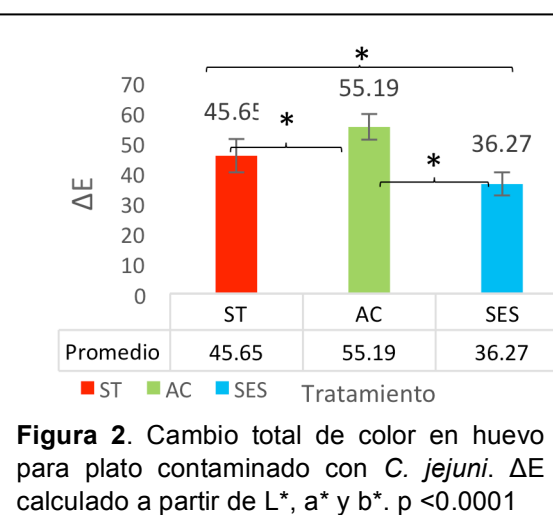
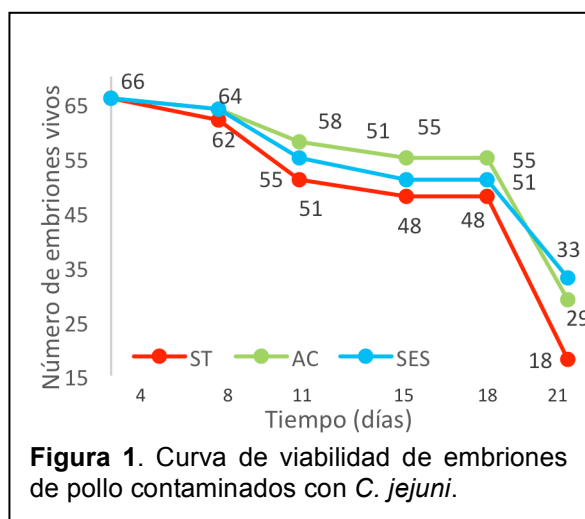
Determinación de fósforo por espectrofotometría de UV-Visible

Realizado a partir del secado, calcinación y digestión ácida (HCl 25 %) de los cascarones. La lectura de absorbancia a 400 nm contra una curva patrón se realizó

posterior a la reacción con el reactivo de molibdo vanadato. Basado en el Método oficial AOAC 965.17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la SES (SoluVet®) con pH neutro presentó las siguientes características fisicoquímicas: pH de 6.86, potencial óxido-reducción (ORP) de 872 mV y concentración de cloro total de 46 ppm. En el caso de la solución con pH neutro, en concentraciones de 56-60 ppm de cloro residual se ha obtenido un buen efecto contra algunos microorganismos patógenos (Kim et. al., 2000), por lo que la SES a evaluar se encontró en un valor muy cercano a lo reportado. En el Figura 1 se observan que el mayor número de pollos nacidos se lograron aplicando el tratamiento SES (50±12 %), seguido de AC 2 % (43±2.6 %). Esto puede indicar que, la cantidad de bacteria que permaneció en los huevos pudo verse disminuida con estos dos tratamientos con respecto al control (ST), en el cual se tuvo 27.27±24 % de viabilidad. La gran afectación en los embriones observada a partir del día 18 corresponde al periodo más crítico en el que ocurre el cambio en la respiración del embrión, de ser corio-alantoidea a pulmonar, momento en que se produce el 50% de las muertes embrionaria*. Las causas pueden llegar a ser la falta de oxígeno o humedad, temperatura incorrecta o posición inadecuada (Galindo y Lisette, 2005). Las verdaderas condiciones en la etapa de eclosión de un embrión es su transporte a una determinada edad a nacedoras en las que también existe un control de temperatura y humedad, equipo con el cual no se disponía.



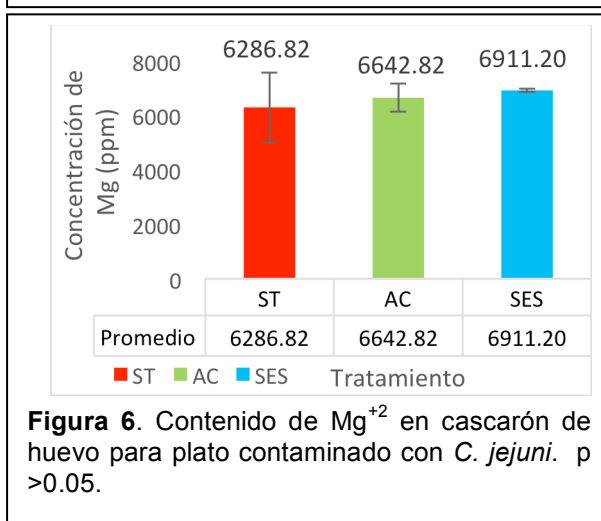
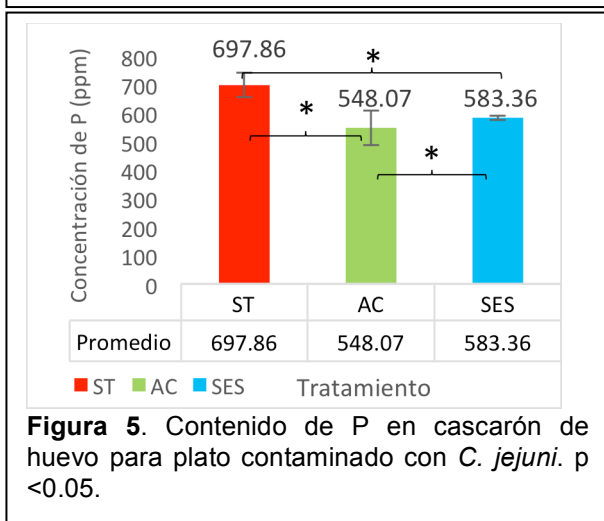
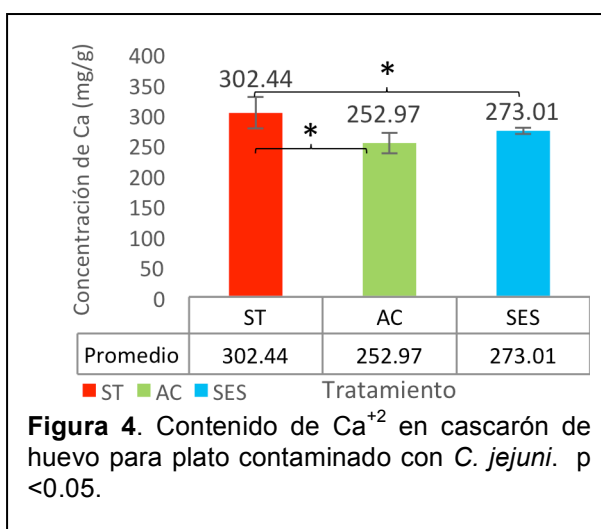
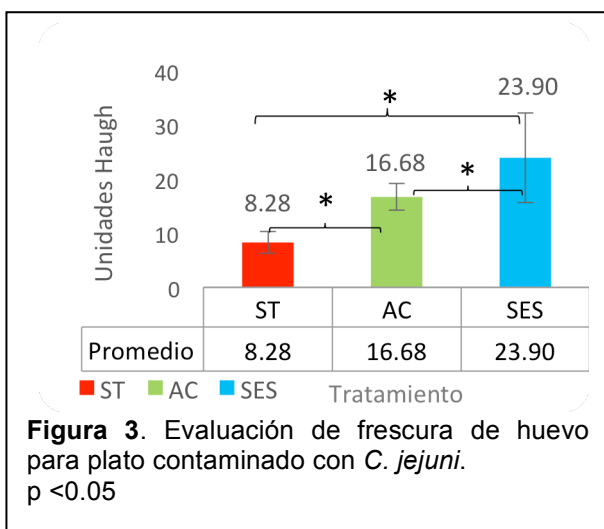
El efecto bactericida de la SES sobre el huevo embrionado, antes sugerido, pretende evaluarse utilizando técnicas moleculares. Sin embargo, como experimento adicional, se realizó una evaluación en huevo para plato por conteo en placa, encontrando una disminución de 2 ciclos logarítmicos en el tratamiento SES correspondiente a un 99.2±1.1 % de reducción con respecto al control (ST), mientras que el tratamiento AC 2 % únicamente redujo la carga bacteriana en un 52.3±35 %. Lo anterior apoya la propuesta de la SES como desinfectante adicional a los estudios de Bialka (2004) aplicada contra otros patógenos.

Con respecto a los análisis en huevo para plato, a partir de los parámetros colorimétricos (L^* , a^* y b^*) fue calculado el cambio total de color (ΔE), encontrando diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los 3 tratamientos, aspecto coincidente con la diferencia en tinción con azul tripán 0.1 % visualmente apreciada. Éste es un colorante azoico utilizado en tinciones histológicas por afinidad a las proteínas (Frei, 2011). De esta manera, se observaría una coloración más intensa conforme existiera un menor daño en la cubierta proteica o cutícula. Sin embargo, lo expuesto en la Figura 2 indicó que el tratamiento con ácido cítrico 2 % tuvo un efecto negativo sobre la cutícula del huevo y provocó la abertura de poros del cascarón al reaccionar con el carbonato y fosfato de calcio, promoviendo la mayor penetración del colorante. En el caso de la SES, aún se desconoce su interacción con el azul tripán y cutícula pero, su menor grado de tinción sugiere que, por su composición como ácido hipocloroso, radicales y otros iones (Fasenko, 2009), no interaccionó con el colorante. Para complementar lo anterior, se evaluaron de los 3 tratamientos por inmersión directa de huevos comerciales encontrando que a los 30 s ya existe un efecto de efervescencia por producción de CO_2 al utilizar AC 2 %, mientras que la SES y el grupo ST no presentaron ningún cambio. Esto confirmó la afectación del AC a la cutícula y cascarón así como el posible nulo daño, al menos visualmente, de la SES.

La Figura 3 indica que las unidades Haugh se mantienen en niveles altos con respecto al grupo ST, al aplicar AC y aún más con SES, presentando diferencia significativa entre todos ellos ($p < 0.001$). Específicamente, la SES mantuvo el valor en 23.90 ± 8.2 , siendo que la NMX-FF-079-SCFI-2004 y el manual del Micrómetro Baxlo indican que alrededor de 20 es el mínimo para considerar al huevo como fresco. Por su parte, los efectos mencionados del tratamiento AC sobre el cascarón, coinciden con la afectación del efecto protector contra la pérdida de humedad por aumento de su porosidad y, en consecuencia de la disminución de frescura. Y, al no recibir ninguno de los tratamientos anteriores, el grupo ST perdió la cutícula reflejado en una mayor extensión del albumen. Otros de los factores que interviene en la calidad del albumen son la edad del animal y la duración y condiciones de almacenamiento. Temperaturas superiores a 15°C provoca la pérdida rápida de la altura del albumen (ISA, 2015), aspecto que debe ser considerado en todos los tratamientos al no haber mantenido las muestras en condiciones de refrigeración.

De acuerdo con A. Schaafsma (2000), el contenido de Ca^{+2} en cascarones de huevo es 295-415 mg/g de muestra. La Figura 4 muestra que los 3 tratamientos obtuvieron valores cercanos, siendo estadísticamente diferentes AC y SES con respecto a ST ($p < 0.05$), mismo comportamiento presentado en fósforo (Figura 5) con diferencia entre todos los tratamientos ($p < 0.05$) y cuyo valor reportado es 200-1400 ppm (Schaafsma, 2000). En AC, la disminución (16.4 % en Ca^{+2} y 21.5 % en P) es debida a la interacción, del ácido con los grupos CO_3^{2-} y PO_4^{-3} . Por su parte, en el tratamiento SES se disminuyó el 9.7 % en Ca^{+2} y 16.4 % en P, lo que sugiere una mínima interacción con los minerales. Además, se ha encontrado que la materia orgánica en la cáscara del huevo actúa como fuente de deposición de CaCO_3 (Siulapwa, 2014) y, el fósforo puede reducir al aumentar la edad de la gallina (Cusack, 2003). Por lo tanto, de haber un efecto sobre la cutícula no apreciado visualmente, puede existir una pérdida de Ca^{+2} .

La Figura 6 indica la cantidad de Mg^{+2} por tratamiento, no encontrando diferencia estadística. El valor referencia indica 3500-5500 ppm (Siulapwa, 2014), por lo que existió un mayor contenido. Sin embargo, valores normales en el contenido de minerales, calidad y resistencia de huevos frescos dependen fuertemente del estado de salud y tipo de alimentación adaptada a la edad y necesidades de las gallinas ponedoras (ISA, 2015). Incluso Cusack en 2003 indicó que el Mg^{+2} aumenta en cascarón de huevo de aves de mayor edad y, por otro lado, existe una relación Mg/Ca y temperatura de deposición, siendo que al aumentar ésta, la precipitación de $CaCO_3$ es más rápida, lo que corresponde a una mayor incorporación de magnesio.



BIBLIOGRAFÍA

- Bialka, K., et al. 2004. Efficacy of Electrolyzed Oxidizing Water for the Microbial Safety and Quality of Eggs. *Poultry Science*. 83: 2071-2078.
- Cusack, M. Fraser, A. Stachel, T. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 134 (1), 63-69.

- Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía. 2004. Norma Mexicana-FF-079-SCFI-2004. Productos Avícolas. Huevo fresco de gallina. Especificaciones y métodos de prueba. En Catálogo de Normas Mexicanas.
- Fasenko, G. O'Dea Christopher, E. McMullen, M. 2009. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poultry Science*. 88 :1121–1127.
- Frei, M. 2011. *Biofiles*. Sigma-Aldrich. 6 (5), 17-19.
- Galindo, R., Lisette, S. 2005. Embriodiagnos y ovoscopia. Análisis y control de calidad de los huevos incubables. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6 (3), 1-25.
- Guentzel, J. et. al. 2008. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*. 25, 36-41.
- Institut de Sélection Animale. 2015. *At ISA our business is eggs*. [En línea] (Actualizado en 2015) Disponible en: <http://www.isapoultry.com/en/support/publications/at-isa-our-business-is-eggs/> [Abril, 2016].
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2014. *Boletín de información oportuna del sector alimentario*. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México).
- Kanji, A. Jones, M. Maskell, D. Grant, A. 2015. *Campylobacter jejuni* PflB is required for motility and colonisation of the chicken gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis*, 89, 93-99.
- Kim, C., Hung, Y., Brackett, R. 2000. Efficacy of electrolyzed oxidizing (OE) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 61: 199-207.
- Schaafsma, A. et. al. 2000. Mineral, Amino Acid, and Hormonal Composition of Chicken Eggshell Powder and the Evaluation of its Use in Human Nutrition. *Poultry Science* 79:1833–1838.
- Siulapwa, N. Mwambungu, A. Mubbunu. 2014. Composition of commercial hen eggshells to fresh water crocodile egg shells. *International Journal of Research In Agriculture and Food Sciences*. 2 (7), 16-18.
- Unión Nacional de Avicultores. 2014. *Creceará 2.5% la avicultura mexicana en 2015*. [En línea] (Actualizado en 2016). Disponible en: <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/crecera-2-5-la-avicultura-mexicana-en-2015> [Abril, 2016].